

IDENTIFICATION ET PERCEPTION DES STIMULUS UTILISES PAR L'ENDOPARASITOÏDE *DIADROMUS PULCHELLUS* LORS DE L'ACCEPTATION DE L'HÔTE (HYMENOPTERA : ICHNEUMONIDAE)

Fabrice BÉNÉDET, Yves BIGOT, Sylvaine RENAULT, Jean POUZAT & Eric THIBOUT

Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte, UPRESA-CNRS 6035,
Faculté des Sciences, Parc de Grandmont, F - 37200 Tours, France

Mots-clés : chimiosensilles de contact, glycopolypeptides, kairomone de contact, parasitoïde, reconnaissance, teigne du poireau

Résumé. – Le principal signal chimique utilisé par le parasitoïde solitaire *Diadromus pulchellus* (Hymenoptera : Ichneumonidae) pour reconnaître et accepter son hôte, se situe au niveau du cocon de soie contenant la chrysalide d'*Acrolepiopsis assectella* (Lepidoptera : Acrolepiidae). Ce signal est perçu par la femelle parasitoïde lors des contacts antennaires avec le cocon. L'analyse biochimique d'extraits aqueux de cocons associée à des tests comportementaux indiquent que quatre glycoprotéines du cocon agissent comme signal d'acceptation. L'information semble par ailleurs uniquement portée par la chaîne polypeptidique. L'étude en microscopie électronique à balayage des antennes du parasitoïde révèle la présence de sensilles chimioréceptrices de contact qui pourraient intervenir dans la "perception" de ce signal protéique.

Abstract. – **Identification and perception of stimulus used by the endoparasitoid *Diadromus pulchellus* (Hymenoptera : Ichneumonidae) during host-acceptance.** – Chemicals from the silk-cocoon in which the *Acrolepiopsis assectella* (Lepidoptera : Acrolepiidae) pupa is concealed are the main chemical signal used by the solitary parasitoid *Diadromus pulchellus* (Hymenoptera : Ichneumonidae) in host-recognition and host-acceptance. This signal is detected by the parasitic wasp through contacts between its antennae and the cocoon. Biochemical analyses carried out on cocoon extracts and behavioural experiments have shown that four glycoproteins act as the host-acceptance signal. Moreover, the information seems to be only carried by the polypeptidic chain. Scanning microscopy studies of the parasitoid antennae have revealed the presence of various contact chemoreceptors that might play a role in the perception of this proteinaceous signal.

Le comportement de sélection de l'hôte par un parasitoïde est généralement divisé en 4 phases : localisation de l'habitat de l'hôte, localisation de l'hôte, acceptation de l'hôte et ponte (DOUTT, 1964 ; VINSON, 1976, 1991). A chacune des phases, des facteurs d'importances diverses interviennent, amenant la femelle parasitoïde à reconnaître puis à accepter ou non, de pondre dans l'hôte potentiel trouvé. Notre étude s'intéresse aux comportements des femelles de *D. pulchellus* lors de l'étape d'acceptation de l'hôte. Cet Hyménoptère est un endoparasitoïde solitaire spécialiste de la chrysalide d'*A. assectella* Zell. dont les larves se nourrissent exclusivement de plantes du genre *Allium* (ALROUZ & THIBOUT,

1988). Le but de notre étude est l'identification des composés chimiques associés au cocon de l'hôte qui déclenchent les premières séquences du comportement d'acceptation chez *D. pulchellus*, ainsi que la localisation des sensilles réceptrices antennaires.

Chez les parasitoïdes, les systèmes sensoriels impliqués lors de cette phase d'acceptation sont d'ordre visuel, tactile et chimiosensible (SCHMIDT, 1991). Des composés chimiques non-volatils semblent être suffisants pour déclencher les premières séquences d'acceptation. (VINSON, 1976, 1991). Chez l'espèce *D. pulchellus*, le signal le plus important pour les femelles semblerait être de nature chimique, non volatile et issu du cocon (THIBOUT, 1988 ; BEKKAOUI & THIBOUT, 1992).

Pour vérifier cette hypothèse et caractériser les composés actifs, deux voies expérimentales ont été suivies. Tout d'abord, des extraits de composés du cocon ont été réalisés, soit par lavage "drastique" dans une solution de guanidine thiocyanate, soit par lavage "sélectif" à l'eau. Ces extraits ont ensuite été testés en comportement et analysés sur gel d'électrophorèse. Dans un second temps, de façon à préciser la nature des composés actifs (sucre ou protéine), des traitements enzymatiques (déglycosylations et protéolyse) ont été réalisés et l'effet sur le comportement des produits obtenus a ensuite été testé.

De façon à déterminer quelles sensilles des antennes de *D. pulchellus* sont susceptibles d'intervenir dans la perception du signal chimique, une étude complémentaire à celle déjà entreprise en microscopie électronique (LECOMTE *et al.*, 1990) à balayage a été réalisée.

Matériel et méthodes

Insectes. – Les parasitoïdes sont élevés en laboratoire dans les conditions thermophotopériodiques suivantes : 16 h à la lumière à 25°C, 60 ± 10% d'humidité relative (HR) ; 8 h à l'obscurité à 15°C, 70 ± 10% HR (LECOMTE & THIBOUT, 1984). Les femelles utilisées pour les expériences sont prélevées dès leur émergence et mises en présence de mâles. Une fois accouplées, elles sont nourries avec de l'eau sucrée, isolées 5 à 6 jours puis utilisées pour les tests (BEKKAOUI & THIBOUT, 1992). L'hôte, *A. assectella*, est élevé au laboratoire sur milieu artificiel supplémenté par de la poudre de poireau (ARNAULT, 1982).

Test comportemental. – La séquence comportementale d'acceptation de l'hôte a été définie comme celle débutant dès le contact du parasitoïde avec le cocon d'*A. assectella*. Cette séquence peut être divisée en quatre étapes (LABEYRIE, 1960) : (1) contacts et tapotements antennaires de l'hôte (chrysalide dans son cocon) par le parasitoïde, (2) le parasitoïde monte sur le cocon et effectue plusieurs aller-retours en frottant et tapotant celui-ci de ses antennes, (3) examen de l'hôte par retournements abdominaux du parasitoïde, (4) insertion de l'abdomen dans le cocon par l'extrémité entre-ouverte et piqure de la chrysalide.

Les tests comportementaux sont effectués en boîtes de Pétri de 5 cm de diamètre. Les femelles sont mises en situation de choix entre un leurre témoin (coton de taille et de forme proche du cocon sur lequel est déposé le solvant d'extraction) et, soit un cocon vide (sans chrysalide ni exuvie) soit un leurre expérimental en coton sur lequel est déposé l'extrait à tester. Les différents éléments sont fixés sur le fond de la boîte pour qu'ils ne soient pas déplacés par l'insecte. Une quantité donnée d'extrait à tester est déposée sur le leurre expérimental, le solvant est évaporé avant l'expérience. L'observation dure 5 à 10 min à partir du moment où un contact de durée supérieure à 3 s est réalisé par la femelle avec l'un des 2 éléments testés. Les contacts de durée inférieure à 3 s et les périodes durant lesquelles les femelles restent immobiles sur l'un des éléments testés ne sont pas comptabilisés. Deux critères comportementaux sont utilisés (BEKKAOUI & THIBOUT, 1992). Le premier est le temps moyen de contact exprimé en s avec chaque élément testé. Les valeurs obtenues pour chaque groupe expérimental sont comparées au moyen du test non-paramétrique de Kruskal-Wallis. Le deuxième critère est le pourcentage de femelles d'un groupe expérimental donné qui réalisent des contacts abdominaux avec le substrat. Les pourcentages sont comparés au moyen d'un test χ^2 .

Isolement et caractérisation du signal protéique. – Pour solubiliser et isoler toutes les protéines du cocon, 500 cocons ont été dissous par incubation, 24 h à température ambiante dans 20 ml d'une solution contenant principalement de la guanidine thiocyanate 4M (CHIRGWIN *et al.*, 1979). L'extrait a été dialysé dans des tubes à dialyse de porosité 12-14 kDa afin d'éliminer les molécules de faible poids

moléculaire telles que les sucres, acides aminés, sels inorganiques ou organiques et les différents détergents, puis lyophilisé.

L'extrait de cocon à l'eau est obtenu en plaçant 500 cocons dans 5 ml d'eau ultra pure pendant 5 min. Après concentration par lyophilisation, l'extrait est fractionné par filtration sur gel, dans une colonne (10 × 0,5 cm) de séphadex G75 avec de l'eau comme éluant. Les petites molécules sont ainsi éliminées. Les fractions contenant les protéines sont rassemblées après contrôle sur gel d'électrophorèse.

L'activité comportementale de l'extrait protéique total dialysé dissout (E1) et celle de l'extrait protéique filtré sur séphadex (E2) ont été testées à des quantités équivalents à 10 cocons lavés.

Déglycosylations et protéolyse. – Un aliquote de l'extrait protéique filtré (E2) est incubé avec de la O-glycosidase (EC 3.2.1.97) et de la N-glycosidase F (EC 3.2.2.18 et EC 3.5.1.52) pendant 4 h à 37°C en suivant le protocole donné par le fabricant (Boehringer Mannheim). Après déglycosylation, les chaînes de sucres sont éliminées par filtration sur colonne de séphadex comme décrit précédemment. Un aliquote non traité sert de contrôle.

Un aliquote de l'extrait protéique filtré (E2) est incubé avec 100 mg / ml de pronase (endo- et exo-protéases aspécifiques, Boehringer Mannheim) dans 10 mM Tris-HCl pH 7,4 pendant 4 h à 37°C. Le résultat de la digestion est contrôlé par électrophorèse. Un aliquote non-traité sert de contrôle.

L'activité comportementale de l'extrait protéique filtré déglycosylé et de son contrôle ainsi que de celle de l'extrait protéique digéré et de son contrôle ont été testées à des quantités équivalents à 10 cocons lavés.

Gel d'électrophorèse et colorations. – Les protéines issues des divers extraits obtenus sont séparées sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE en conditions dénaturantes (LAEMMLI, 1970). Les gels sont colorés au bleu de Coomassie® ou au nitrate d'argent.

Préparation des antennes pour la microscopie électronique à balayage. – Les femelles de *D. pulchellus* sont disséquées et les têtes avec leurs antennes sont déshydratées par passages dans des bains d'éthanol de degré croissant, puis d'acétone. Les échantillons sont collés sur des plots en laiton et métallisés à l'or. L'observation est faite à l'aide d'un microscope à balayage DSM 982 Gemini, plus performant que celui utilisé dans les précédentes études (LECOMTE *et al.*, 1990).

RESULTATS

Activité des extraits E1 et E2 de cocons après élimination des petites molécules

Les femelles ne passent significativement pas plus de temps en contact avec le cocon qu'avec des leurres en coton imprégnés d'extrait E1 ou E2 n'ayant subi aucun traitement enzymatique (Test de Kruskal-Wallis, $p = 0,30$). De même, le pourcentage de femelles présentant des contacts abdominaux avec les cocons (95%) n'est pas statistiquement différent de celui observé avec des leurres imprégnés d'extraits E1 (83,3%) ou E2 (92%) ($\chi^2 = 1,99$; d.d.l. = 2 ; $p = 0,37$) (fig. 1). Ainsi, les composés induisant l'acceptation de l'hôte sont des molécules de poids moléculaire supérieure à 12 kDa correspondant probablement à des protéines ou des glycoprotéines.

Caractéristiques des protéines du cocon séparées sur SDS-PAGE

L'extrait E1, après coloration du gel au bleu de Coomassie®, présente un profil de protéines de 20 à 330 kDa. Dix bandes sont quantitativement majoritaires (fig. 2). L'extrait E2 présente un profil simplifié (fig. 3, GP⁻), comportant 4 bandes de 70, 78, 86 et 90 kDa correspondant donc aux protéines les plus hydrosolubles. Le profil protéique de l'extrait E2 après N-déglycosylation est différent du profil de l'extrait non traité. Seules deux bandes sont présentes à 67 et 80 kDa (fig. 3, P⁺). La O-déglycosylation ne change pas le profil (résultats non montrés). Ces résultats suggèrent que l'extrait E2 contient 4 protéines N-glycosylées. L'hydrolyse par la pronase conduit à la fragmentation des protéines en peptides (résultats non montrés).

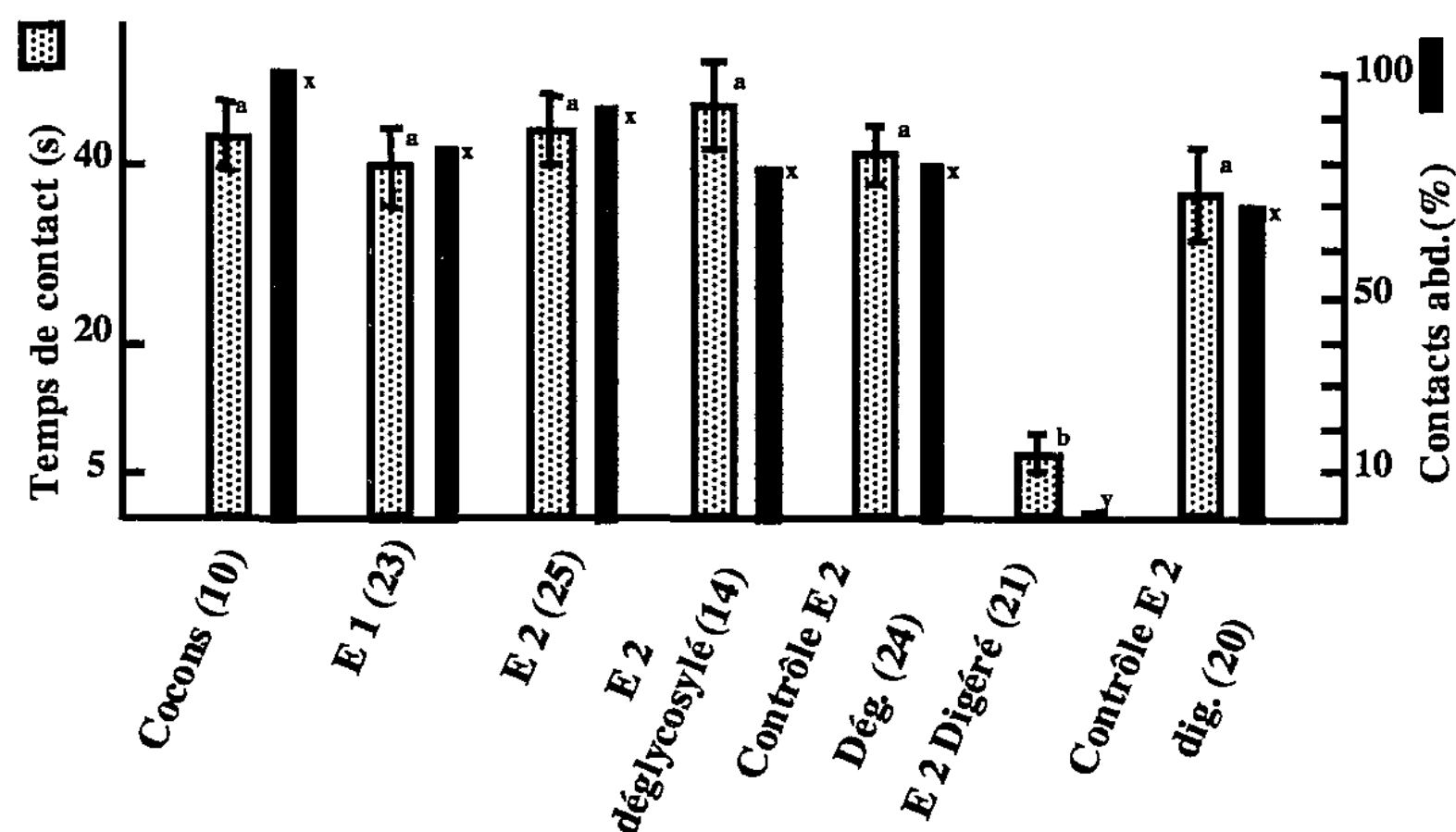


Fig. 1, temps moyen de contact (\pm SEM) (barres grises, légende à gauche) et pourcentage moyen de femelles présentant des contacts abdominaux (barres noires, légende à droite) chez les femelles *D. pulchellus* mises en présence de cocons ou de leurres imprégnés d'extraits variés. Les valeurs relatives au témoin sont absentes car très faibles (temps moy. $< 0,8$ s, contacts abdominaux : 0%). Les valeurs entre parenthèses correspondent au nombre de répétitions. Les données avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à $p = 0,05$ (test de Kruskal-Wallis).

Activité comportementale des extraits protéiques après déglycosylation ou protéolyse

L'activité comportementale déclenchée par les protéines du cocon pourrait être due, soit aux chaînes de sucre, soit aux chaînes protéiques, soit encore aux glycoprotéines entières. Les extraits E2, natif, déglycosylé ou protéolysé et leur contrôle correspondant (sans traitement enzymatique), ont été comparés pour leur capacité à déclencher le comportement d'acceptation. Pour les deux critères comportementaux, il existe une différence significative entre l'extrait E2 après protéolyse et l'ensemble des autres extraits (fig. 1). Les chaînes polypeptidiques semblent donc nécessaires et suffisantes pour induire l'acceptation de l'hôte.

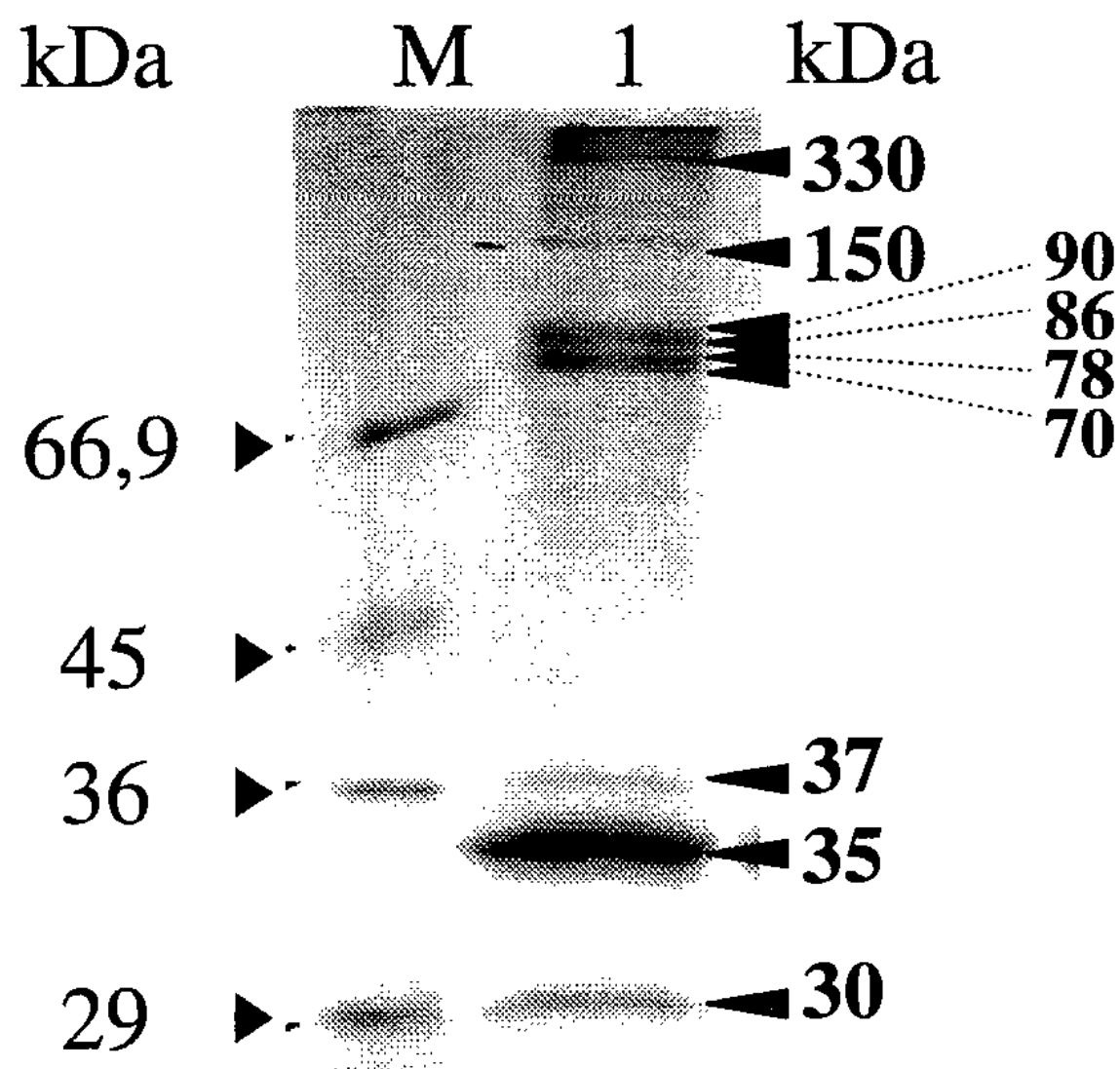


Fig. 2, profil SDS-PAGE d'un extrait protéique dialysé de cocon d'*A. assectella* (E 1). Gel à 10 %, 20 mg de E 1 coloré au bleu de Coomassie® (1). Les poids moléculaires sont exprimés en kDa. (M).

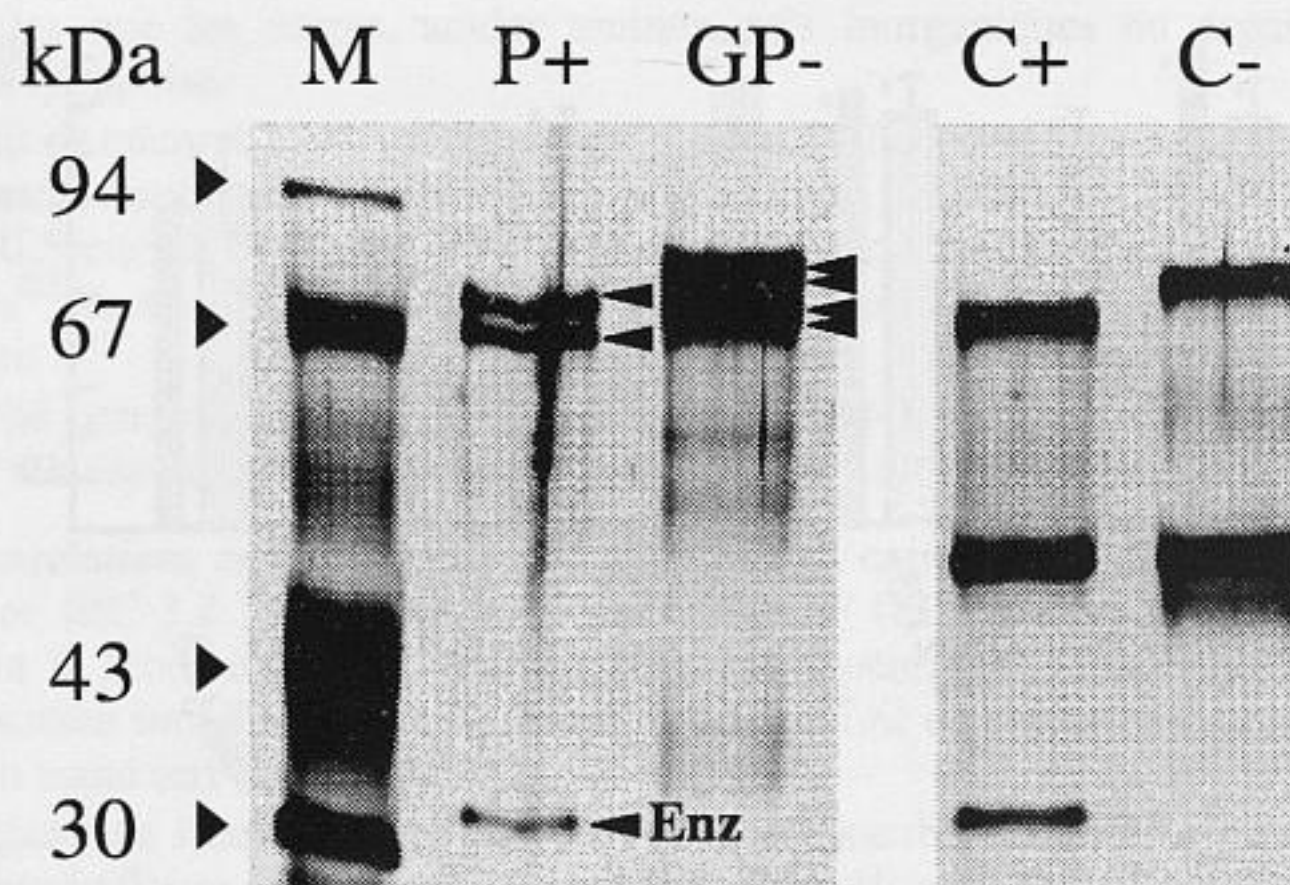


Fig. 3., profil SDS-PAGE de protéines du cocon d'*A. assectella* (gel à 10% en polyacrylamide coloré à l'argent). Extrait protéique filtré E2 traité par la N-glycosidase F (Enz) (P+), extrait E2 non traité (GP-), protéine et glycoprotéine connues utilisées comme contrôle de déglycosylation (C+ et C-). Les poids moléculaires sont exprimés en kDa (M).

Sensilles de l'antenne

Le dernier antennomère, comme les autres antennomères du flagelle comporte un grand nombre de sensilles (fig. 4 a). Chez les femelles *D. pulchellus*, 8 sortes de sensilles morphologiquement différentes ont été observées, confirmant les travaux de LECOMTE et al. (1990). Deux types présentent une morphologie caractéristique de sensilles chimioréceptrices de contact du fait de la présence d'un pore unique à leur extrémité (Fig. 4 b, 4 c). Ces sensilles pourraient être celles capables de détecter les protéines mises en évidence par cette étude.

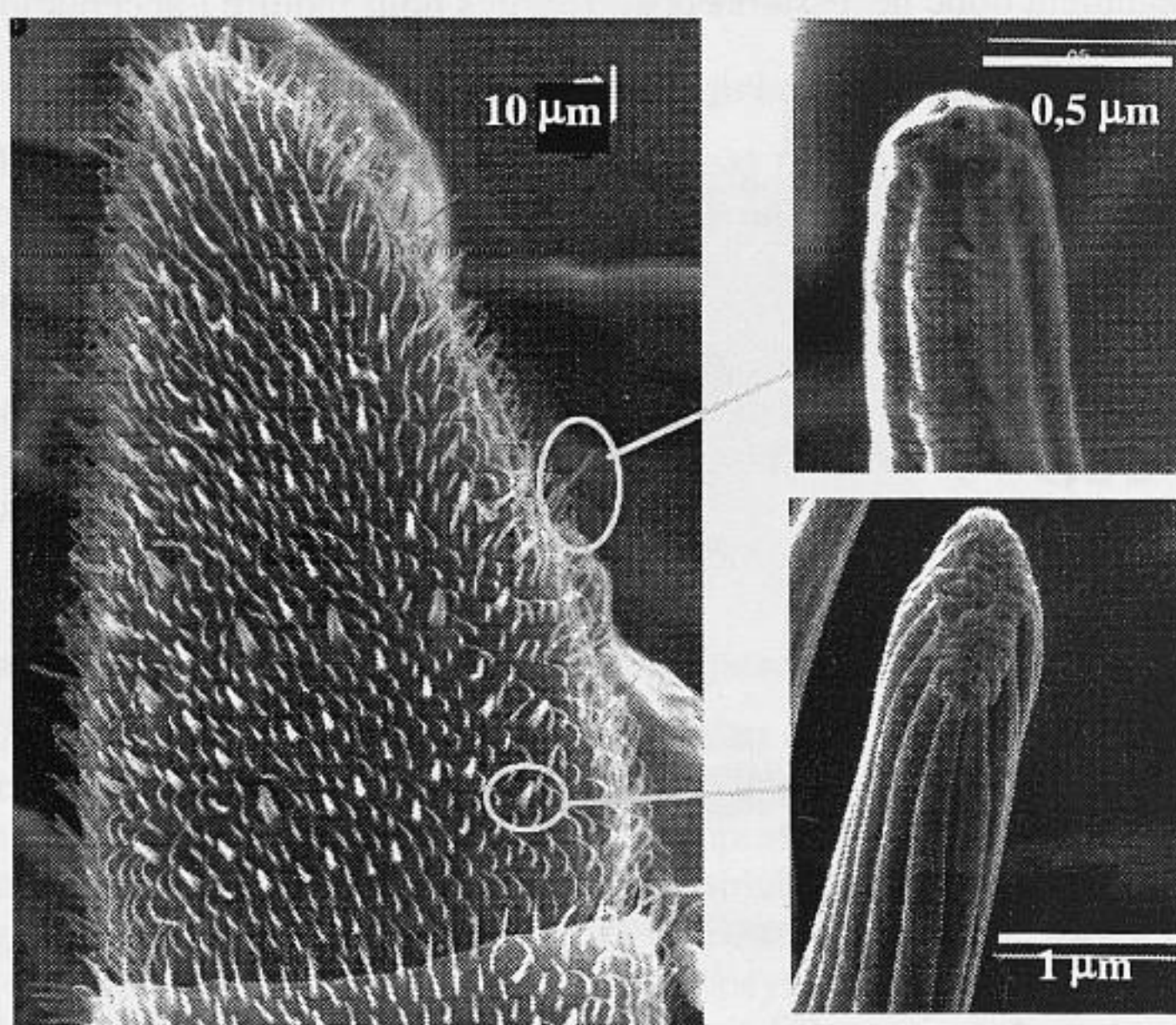


Fig. 4, (A) antennomère apical d'une femelle de *D. pulchellus* en microscopie électronique à balayage. Sensilles chimioréceptrices de contact (B et C).

DISCUSSION

Cette étude confirme que *D. pulchellus* utilise une information issue du cocon de son hôte lors de la phase d'acceptation (THIBOUT, 1988 ; BEKKAOUI & THIBOUT, 1993). Dans un système hôte-parasitoïde comparable, la possibilité de l'intervention d'une kairomone de nature protéique lors de cette étape avait été émise par WESELOH (1977). Par ailleurs, l'utilisation de deux protéines de l'œuf hôte d'*Heliothis virescens* (Lepidoptera : Noctuidae) par le parasitoïde oophage *Telenomus heliothidis* (Hymenoptera : Scelionidae) comme signal de reconnaissance a été démontrée (STRAND & VINSON, 1982, 1983). Le cocon d'*A. assectella* contient 10 protéines majoritaires de 20 à 330 kDa. Ce nombre est comparable à celui rencontré pour les cocons d'autres Lépidoptères (PRUDHOMME *et al.*, 1985). La présence de seulement deux bandes après déglycosylation de l'extrait E2, indique que les 4 glycoprotéines du cocon correspondent à deux formes glycosylées différentes. L'une d'entre elles, au moins, est active. Les chaînes de carbohydrates sont de type N-acétylglucosamine liées à l'asparagine. Ce type de liaison est le plus fréquent et a déjà été identifié sur des protéines de soie du cocon de *Bombyx mori* (Lepidoptera : Bombycidae) (SINOHARA, 1979). Les résultats des tests comportementaux obtenus après déglycosylation des protéines et protéolyse suggèrent que les chaînes polypeptidiques seules sont à l'origine du signal induisant le comportement de reconnaissance de l'hôte par le parasitoïde. Ce résultat est à opposer à celui obtenu par SNELL *et al.* (1995), qui démontre que l'activité phéromonale chez les Rotifères est due aux chaînes carbohydratées d'une glycoprotéine.

Un tel type de signal doit être perçu par des chimiorécepteurs de contact. L'étude en microscopie à balayage, a permis de retrouver la totalité des sensilles inventoriées lors de précédents travaux (LECOMTE *et al.*, 1990). L'amélioration de la qualité des images a permis de sélectionner deux types de sensilles dont la structure externe comporte soit un pore unique, soit une extrémité arrondie marquée de cannelures ouvertes. La morphologie d'une sensille ne permet cependant pas de conclure sur sa fonction ; seules des études ultrastructurales et électrophysiologiques permettront de conclure. Des études en cours ont permis d'obtenir des contacts électriques sur ces 2 types de sensilles à partir d'enregistrements électrophysiologiques. Ces sensilles semblent donc être des chimiorécepteurs de contact.

LITTÉRATURE CITÉE

- ALROUZ H. & THIBOUT E., 1988. – Premières observations sur le comportement alimentaire des larves de la teigne du poireau, *Acrolepiopsis assectella*, rôle des *Allium*. – *Acta Oecologica. Oecologia applicata*, **9** : 261-273.
- ARNAULT C., 1982. – Conséquences de l'alimentation artificielle sur le développement larvaire de la teigne du poireau, *Acrolepiopsis assectella*. – *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **32** : 116-122.
- BEKKAOUI A. & THIBOUT E., 1992. – Rôle de substances cuticulaires non volatiles d'*Acrolepiopsis assectella* (Lep. : Hyponomeutoidea) dans la reconnaissance de l'hôte par les parasitoïdes *Diadromus pulchellus* et *D. collaris* (Hym. : Ichneumonidae). – *Entomophaga*, **37** : 627-639.
- 1993. – Role of the cocoon of *Acrolepiopsis assectella* (Lep. : Yponomeutoidea) in host recognition by the parasitoid *Diadromus pulchellus* (Hym. : Ichneumonidae). – *Entomophaga*, **38** : 101-113.
- CHIRGWIN J.M., PZYBYLA A.E., MACDONALD R.J. & RUTTER W.J., 1979. – Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. – *Biochemistry*, **18** : 5294-5299.
- DOUTT R. L., 1964. – Biological characteristics of entomophagous adults. – In : De Bach P. (ed). *Biological Control of Insect Pests and Weeds*, p. 145-167. London : Chapman & Hall.
- LABEYRIE V., 1960. – Contribution à l'étude de la dynamique des populations d'insectes : I. Influence stimulatrice de l'hôte *Acrolepiopsis assectella* Z. sur la multiplication d'un hyménoptère Ichneumonidae (*Diadromus pulchellus*). – *Entomophaga* Hors série, **1** : 1-193.
- LAEMMLI U. K., 1970. – Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. – *Nature*, **227** : 680-685.
- LECOMTE C. & THIBOUT E., 1984. – Etude olfactométrique de l'action de diverses substances allélochimiques végétales dans la recherche de l'hôte par *Diadromus pulchellus* (Hymenoptera : Ichneumonidae). – *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **35** : 295-303.
- LECOMTE C., THIBOUT E. & THIBEAUDEAU C., 1990. – Etude en microscopie électronique à balayage, des organes sensoriels de *Diadromus pulchellus* WSM (Hymenoptera : Ichneumonidae). II. L'ovipositeur et les tarses des femelles. – *Bulletin de la Société Scientifique de Bretagne*, **62** : 9-24.

- PRUDHOMME J.C., COUBLE P., GAREL J.P. & DAILLIE J., 1985. — Silk synthesis. In : Kerkut G. A. & Gilbert L. I. (eds), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. p. 571-594. Oxford : Pergamon Press.
- SCHMIDT J. M., 1991. — The role of physical factors in tritrophic interactions. — *Redia* : 74 Appendice, 43-93.
- SINOHARA H., 1979. — Glycopeptides isolated from sericin of the silkworm, *Bombyx mori*. — *Comparative Biochemistry and Physiology*, **63B** : 87-91.
- SNELL T.W., RICO-MARTINEZ R., KELLY L.N. & BATTLE T.E., 1995. — Identification of a sex pheromone from a rotifer. — *Marine Biology*, **123** : 347-353.
- STRAND M.R. & VINSON S.B., 1982. — Source and characterization of an egg recognition kairomone of *Telenomus heliothidis*, a parasitoid of *Heliothis virescens*. — *Physiological Entomology*, **7** : 83-90.
- 1983. — Analyses of an egg recognition kairomone of *Telenomus heliothidis* (Hymenoptera : Scelionidae). Isolation and host function. — *Journal of Chemical Ecology*, **9** : 423-432.
- THIBOUT E., 1988. — La spécificité de *Diadromus pulchellus* (Hyménoptère : Ichneumonidae) vis-à-vis de son hôte *Acrolepiopsis assectella*, la teigne du poireau. — *Entomophaga*, **33** : 439-452.
- VINSON S. B., 1976. — Host selection by insect parasitoids. — *Annual Review of Entomology*, **21** : 109-133.
- 1991. — Chemical signals used by parasitoids. — *Redia*, 74 Appendice : 15-42.
- WESELOH R.M., 1977. — Effects on behavior of *Apanteles melanoscelus* females caused by modifications in extraction, storage, and presentation of gypsy moth silk kairomone. — *Journal of Chemical Ecology*, **3** : 723-735.